

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
17. Juli 2003 (17.07.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/057909 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12Q 1/68**
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE03/00073
- (22) Internationales Anmeldedatum:
8. Januar 2003 (08.01.2003)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
102 01 138.9 8. Januar 2002 (08.01.2002) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **EPIGENOMICS AG** [DE/DE]; Kastanienallee 24,
10435 Berlin (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **BERLIN, Kurt**
[DE/DE]; Marienkäferweg 4, 14532 Stahnsdorf (DE).
- (74) Anwalt: **SCHUBERT, Klemens**; Neue Promenade 5,
10178 Berlin-Mitte (DE).

- (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) **Title:** METHOD FOR DETECTING CYTOSINE-METHYLATION PATTERNS BY EXPONENTIAL LIGATION OF HYBRIDISED PROBE OLIGO-NUCLEOTIDES (MLA)

(54) **Bezeichnung:** VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON CYTOSIN-METHYLIERUNGSMUSTERN DURCH EXPONENTIELLE LIGATION HYBRIDISierter SONDENOLIGONUKLEOTIDE (MLA)

(57) **Abstract:** The invention relates to a method for detecting cytosine-methylation in DNA samples which consists of the following steps: firstly, a genomic DNA sample, which comprises background DNA and DNA which is to be examined, is chemically treated in such a way that all non-methylated cytosine bases are converted into uracil, whereby the 5-methyl cytosine bases remain unchanged. The DNA sample which has been chemically treated is then amplified by using at least 2 primer-oligo-nucleotides and a polymerase, the DNA which is to be examined with respect to the background DNA is preferred as a template. In the final step, the amplicates are analysed and on the basis of the presence of an amplicate and/or from the analysis of further positions information on the methylation status is deduced in the DNA which is to be examined.

(57) **Zusammenfassung:** Beschrieben wird ein Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierung in DNA-Proben, das aus den folgenden Schritten besteht: Zuerst wird eine genomische DNA-Probe, welche zu untersuchende DNA und Hintergrund-DNA umfasst, chemisch derart behandelt, dass alle nicht methylierten Cytosinbasen in Uracil umgewandelt werden, während die 5-Methylcytosinbasen unverändert bleiben. Dann wird die chemisch behandelte DNA-Probe unter Verwendung von mindestens 2 Primeroligonukleotiden sowie einer Polymerase amplifiziert, wobei die zu untersuchende DNA gegenüber der Hintergrund-DNA als Templat bevorzugt wird und im letzten Schritt werden die Amplifikate analysiert und aus dem Vorliegen eines Amplifikates und/oder aus der Analyse weiterer Positionen auf den Methylierungsstatus in der zu untersuchenden DNA geschlossen.



WO 03/057909 A2

**Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierungsmustern
durch exponentielle Ligation hybridisierter
Sondenoligonukleotide (MLA)**

5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum
Nachweis von Cytosin-Methylierung in DNA-Proben.

Die nach den methodischen Entwicklungen der letzten Jahre
in der Molekularbiologie gut studierten Beobachtungsebe-
10 nen sind die Gene selbst, die Übersetzung dieser Gene in
RNA und die daraus entstehenden Proteine. Wann im Laufe
der Entwicklung eines Individuums welches Gen angeschal-
tet wird und wie Aktivieren und Inhibieren bestimmter Ge-
ne in bestimmten Zellen und Geweben gesteuert wird, ist
15 mit Ausmaß und Charakter der Methylierung der Gene bzw.
des Genoms korrelierbar. Insofern äußern sich pathogene
Zustände in einem veränderten Methylierungsmuster einzel-
ner Gene oder des Genoms.

20 5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte
Base in der DNA eukaryotischer Zellen. Sie spielt bei-
spielsweise eine Rolle in der Regulation der Transkripti-
on, beim genetischen Imprinting und in der Tumorgenese.
Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil
25 genetischer Information ist daher von erheblichem Inte-
resse. 5-Methylcytosin-Positionen können jedoch nicht
durch Sequenzierung identifiziert werden, da 5-Methyl-
cytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweist wie
Cytosin. Darüber hinaus geht bei einer PCR-Amplifikation
30 die epigenetische Information, welche die 5-Methylcyto-
sine tragen, vollständig verloren.

Eine relativ neu und die mittlerweile am häufigsten ange-
wandte Methode zur Untersuchung von DNA auf 5-Methyl-
35 cytosin beruht auf der spezifischen Reaktion von Bisulfit
mit Cytosin, das nach anschließender alkalischer Hydroly-

se in Uracil umgewandelt wird, welches in seinem Basenpaarungsverhalten dem Thymidin entspricht. 5-Methylcytosin wird dagegen unter diesen Bedingungen nicht modifiziert. Damit wird die ursprüngliche DNA so umgewandelt, dass Methylcytosin, welches ursprünglich durch sein Hybridisierungsverhalten vom Cytosin nicht unterschieden werden kann, jetzt durch „normale“ molekularbiologische Techniken als einzig verbliebenes Cytosin beispielsweise durch Amplifikation und Hybridisierung oder Sequenzierung nachgewiesen werden kann. Alle diese Techniken beruhen auf Basenpaarung, welche jetzt voll ausgenutzt wird. Der Stand der Technik, was die Empfindlichkeit betrifft, wird durch ein Verfahren definiert, welches die zu untersuchende DNA in einer Agarose-Matrix einschließt, dadurch die Diffusion und Renaturierung der DNA (Bisulfit reagiert nur an einzelsträngiger DNA) verhindert und alle Fällungs- und Reinigungsschritte durch schnelle Dialyse ersetzt (Olek A, Oswald J, Walter J. A modified and improved method for bisulphate based cytosine methylation analysis. Nucleic Acids Res. 1996 DEC 15;24(24):5064-6). Mit dieser Methode können einzelne Zellen untersucht werden, was das Potential der Methode veranschaulicht. Allerdings werden bisher nur einzelne Regionen bis etwa 3000 Basenpaare Länge untersucht, eine globale Untersuchung von Zellen auf Tausenden von möglichen Methylierungsanalysen ist nicht möglich. Allerdings kann auch dieses Verfahren keine sehr kleinen Fragmente aus geringen Probenmengen zuverlässig analysieren. Diese gehen trotz Diffusionsschutz durch die Matrix verloren.

Eine Übersicht über die weiteren bekannten Möglichkeiten, 5-Methylcytosine nachzuweisen, kann aus dem folgenden Übersichtsartikel entnommen werden: Rein T, DePamphilis ML, Zorbas H. Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes. Nucleic Acids Res. 1998 May 15;26(10):2255-64.

Die Bisulfit-Technik wird bisher bis auf wenige Ausnahmen (z. B. Zeschnigk M, Lich C, Buiting K, Dörfler W, Horsthemke B. A single-tube PCR test for the diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome based on allelic methylation differences at the SNRPN locus. Eur J Hum Genet. 1997 Mar-Apr;5(2):94-8) nur in der Forschung angewendet. Immer aber werden kurze, spezifische Stücke eines bekannten Gens nach einer Bisulfit-Behandlung amplifiziert und entweder komplett sequenziert (Olek A, Walter J. The pre-implantation ontogeny of the H19 methylation imprint. Nat Genet. 1997 Nov.;17(3):275-6) oder einzelne Cytosin-Positionen durch eine „Primer-Extension-Reaktion“ (Gonzalgo ML, Jones PA. Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). Nucleic Acids Res. 1997 Jun. 15;25(12):2529-31, WO-Patent 9500669) oder einen Enzymschnitt (Xiong Z, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. Nucleic Acids Res. 1997 Jun. 15;25(12):2532-4) nachgewiesen. Zudem ist auch der Nachweis durch Hybridisierung beschrieben worden (Olek et al., WO 99 28498).

Harnstoff verbessert die Effizienz der Bisulfit-Behandlung vor der Sequenzierung von 5-Methylcytosin in genomischer DNA (Paulin R, Grigg GW, Davey MW, Piper AA. Urea improves efficiency of bisulphate-mediated sequencing of 5'-methylcytosine in genomic DNA. Nucleic Acids Res. 1998 Nov. 1;26(21):5009-10).

Weitere Publikationen, die sich mit der Anwendung der Bisulfit-Technik zum Methylierungsnachweis bei einzelnen Genen befassen, sind:

Grigg G, Clark S. sequencing 5-methylcytosine residues in genomic DNA. Bioassays. 1994 Jun.;16(6):431-6, 431;
Zeschnigk M, Schmitz B, Dittrich B, Buiting K, Horsthemke

B, Dörfler W. Imprinted segments in the human genome: different DNA methylation patterns in the Prader-Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method. Hum Mol Genet. 1997 Mar;6(3):387-95; Feil R, Charlton J, Bird AP, Walter J, Reik W. Methylation analysis on individual chromosomes: improved protocol for bisulphate genomic sequencing. Nucleic Acids Res. 1994 Feb. 25;22(4):695-6; Martin V, Ribieras S, Song-Wang X, Rio MC, Dante R. Genomic sequencing indicates a correlation between DNA hypomethylation in the 5' region of the pS2 gene and its expression in human breast cancer cell lines. Gene. 1995 May 19;157(1-2):261-4; WO 97 46705, WO 95 15373 und WO 45560.

Ein weiteres bekanntes Verfahren ist die sogenannte methylierungssensitive PCR (Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. (1996), Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci U S A. Sep 3;93(18):9821-6). Für dieses Verfahren werden Primer verwendet, die entweder nur an eine Sequenz hybridisieren, die durch die Bisulfit-Behandlung einer an der betreffenden Position un-methylierten DNA entsteht, oder aber umgekehrt Primer, welche nur an eine Nukleinsäure bindet, die durch die Bisulfit-Behandlung einer an der betreffenden Position un-methylierten DNA entsteht. Mit diesen Primer können demnach Amplifikate erzeugt werden, deren Detektion wiederum Hinweise auf das Vorliegen einer methylierten oder un-methylierten Position in der Probe liefern, an welche die Primer binden.

Ein neueres Verfahren ist auch der Nachweis von Cytosin-Methylierung mittels einer Taqman PCR, das als Methyl-Light bekannt geworden ist (WO00/70090). Mit diesem Verfahren ist es möglich, den Methylierungsstatus einzelner oder weniger Positionen direkt im Verlauf der PCR nach-

zuweisen, so dass sich eine nachfolgende Analyse der Produkte erübrigt.

Matrix-assistierte Laser Desorptions/Ionisations-

5 Massenspektrometrie (MALDI-TOF) ist eine sehr leistungsfähige Entwicklung für die Analyse von Biomolekülen (Karras M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons.

Anal Chem. 1988 Oct. 15;60(20):2299-301). Ein Analyt wird
10 in eine lichtabsorbierende Matrix eingebettet. Durch einen kurzen Laserpuls wird die Matrix verdampft und das Analytmolekül so unfragmentiert in die Gasphase befördert. Durch Stöße mit Matrixmolekülen wird die Ionisation des Analyten erreicht. Eine angelegte Spannung beschleunigt die Ionen in ein feldfreies Flugrohr. Auf Grund ihrer
15 verschiedenen Massen werden Ionen unterschiedlich stark beschleunigt. Kleinere Ionen erreichen den Detektor früher als größere.

20 MALDI-TOF Spektroskopie eignet sich ausgezeichnet zur Analyse von Peptiden und Proteinen. Die Analyse von Nukleinsäuren ist etwas schwieriger (Gut, I. G. und Beck, S. (1995), DNA and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends 1: 147-157.) Für Nukleinsäuren
25 ist die Empfindlichkeit etwa 100 mal schlechter als für Peptide und nimmt mit zunehmender Fragmentgröße überproportional ab. Für Nukleinsäuren, die ein vielfach negativ geladenes Rückgrat haben, ist der Ionisationsprozeß durch
30 die Matrix wesentlich ineffizienter.

Genomische DNA wird durch Standardmethoden aus DNA von Zell-, Gewebe- oder sonstigen Versuchsproben gewonnen. Diese Standardmethodik findet sich in Referenzen wie
35 Fritsch und Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989.

Verfahren zur Amplifikation von DNA Fragmenten sind Stand der Technik. Die am häufigsten verwendete Methode, die Polymerasekettenreaktion PCR), wird vornehmlich zur Amplifikation diskreter Fragmente genomischer DNA unter Verwendung zweier Primer verwendet. Das oben erwähnte Verfahren zur Methylierungsdetektion, MSP, bedient sich ebenfalls dieser Methode. Auch andere Methoden zum Methylierungsnachweis, die auf Bisulfit-behandelter DNA aufbauen, bedienen sich der PCR als Amplifikationsmethode um Sensitivitätsprobleme zu überwinden.

Eine weitere bekannte Methode zur exponentiellen Amplifikation von Fragmenten ist die Ligase-Kettenreaktion (LCR). Diese Methode ist weniger zur Amplifikation von genomischen Abschnitten geeignet, sehr gut aber für beispielsweise die Mutationsdetektion. Eine Ligation findet nur statt, wenn zwei Sonden unmittelbar benachbart an das Templat hybridisieren und keine Basenfehlpaarung dort besteht, wo diese Sonden aneinander angrenzen. Wie die PCR kann die LCR als exponentielle Amplifikation mittels beispielsweise einer thermostabilen Ligase ausgeführt werden (siehe z.B. WO 94/08047). Wie die PCR ist auch die LCR multiplexierbar.

Weitere wesentliche Patente hinsichtlich LCR sind EP0320308 und EP0439182. In letzterem ist einer Kombination der LCR mit einer Polymerasereaktion beschrieben.

Es sind demnach bislang vielerlei Verfahren zur Methylierungsanalyse Stand der Technik. Die vorliegende Erfindung soll jedoch besonders vorteilhaft eine der LCR ähnliche Amplifikationstechnik zur Detektion insbesondere einer kleinen Gruppe von CpG Positionen mit gleichem Methylierungsstatus kombinieren.

In einer Methylierungssensitiven PCR werden beide Primer so ausgewählt, dass sie zumeist mehrere methylierbare, auf ihren Methylierungsstatus hin zu untersuchende Positionen überdecken. Nur dann, wenn diese zumeist 3 oder
5 mehr Positionen einen im wesentlichen gleichen Methylierungsstatus aufweisen (z.B. alle methyliert), erfolgt eine Hybridisierung des Primers an die betreffende Position im Templat und eine Amplifikation mittels PCR kann stattfinden. Werden beide Primer derart ausgewählt, so ist es
10 möglich, sehr hohe Sensitivitäten der Methode zu erreichen. So können beispielsweise 1 durchgehende aufmethyliertes Templat in einem Hintergrund von 10.000 unmethylierten Templaten nachgewiesen werden, da die unmethylierten Template bei Verwendung entsprechend spezifischer
15 Primer nicht amplifiziert werden.

Ein Nachteil der Methode ist jedoch auch gerade ihre Sequenzabhängigkeit. Es ist erforderlich, eben auch genau solche Positionen zu finden, die co-methyliert vorliegen, um entsprechende Sensitivitäten zu erreichen. Sind die
20 CpG Positionen zu weit voneinander entfernt, so sind sehr lange Primer erforderlich, was wiederum für die PCR an sich ungünstig sein kann und auch nachteilig für die Sensitivität sein kann. Auch liegt die Annealingtemperatur von solchen Primern dann sehr hoch. Auch ist es erforderlich, für die Generierung eines methylierungssensitiven
25 PCR Produktes eine weitere Gruppe von co-methylierten Positionen zu finden, für den entsprechenden Reverse-Primer. Dies ist nicht in allen Fällen möglich. Trotzdem sollten zwei Primer methylierungsspezifisch binden, da
30 sonst eine hinreichende Sensitivität nicht zu erreichen ist.

Daher ist es sinnvoll, eine möglichst hohe Spezifität der Bindung zweier Sonden oder Primer in bereits einer zusammenhängenden Gruppe von Methylierungspositionen zu erreichen.
35

Dies ist mit der hier vorgestellten Methylierungssensitiven Ligation und Amplifikation (MLA) zu erreichen. Von einer LCR unterscheidet sie sich insofern, als die Spezifität nicht wesentlich durch den Ligationsschritt selbst beeinflusst wird, wie dies in der Punktmutationsanalyse der Fall ist. Bei der MLA findet eine Ligation im wesentlichen dann statt, wenn die beiden eingesetzten Oligonukleotidsonden (oder Primer) benachbart hybridisieren. Sie hybridisieren dann, wenn der Methylierungsstatus in der genomischen Probe für beide Sondenpositionen entweder methyliert oder unmethyliert vorlag.

Bei der vorliegenden Erfindung handelt es sich also um ein Verfahren, welches Nachteile des Stand der Technik im Bereich der Methylierungsdetektion überwindet. Es kann zur Amplifikation und für den indirekten Nachweis des Methylierungsstatus einer Gruppe von CpG Positionen verwendet werden.

Dies kann insbesondere auch zur selektiven Amplifikation einer zu untersuchenden DNA mit einem bestimmten Methylierungsstatus bei Anwesenheit von sequenzhomologer Hintergrund-DNA mit einem anderen Methylierungsstatus eingesetzt werden.

Vorweg sollen die Begriffe zu untersuchende DNA sowie Hintergrund DNA im Sinne dieser Erfindung am Beispiel des Standes der Technik (MSP) erläutert werden. Die zu untersuchende DNA sowie die ansonsten vorhandenen, im folgenden Hintergrund-DNA genannten Nukleinsäuren, werden ansonsten gleichermaßen amplifiziert, da die verwendeten Primer auch nicht in der Lage sind, zwischen zu untersuchender DNA und Hintergrund-DNA zu unterscheiden. Eine Möglichkeit zur Unterscheidung dieser DNAs ergibt sich jedoch durch das unterschiedliche Methylierungsmuster. Ein gängiges Verfahren ist die methylierungssen-

sitive PCR, kurz MSP (Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. (1996), Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci U S A. Sep 3;93(18):9821-6). Dieses

5 Verfahren besteht aus mehreren Teilschritten. Zunächst wird eine dem Stand der Technik entsprechende Bisulfit-Behandlung durchgeführt, welche wiederum dazu führt, dass alle Cytosinbasen in Uracil umgewandelt werden, während die methylierten Cytosinbasen (5-Methylcytosin) unverändert

10 bleiben. Im nächsten Schritt verwendet man nun Primer, welche vollständig komplementär zu einer methylierten, mit Bisulfit umgewandelten DNA sind, nicht jedoch zu einer entsprechenden DNA welche ursprünglich nicht methyliert vorlag. Das führt bei der Durchführung einer PCR

15 mit einem solchen Primer dazu, dass ausschließlich die ursprünglich methylierte DNA amplifiziert wird. Entsprechend ist es möglich, einen Primer zu verwenden, der im Gegenzug nur die unmethylierte DNA amplifiziert. Auf diese Art und Weise können, wenn zu analysierende DNA sowie

20 Hintergrund DNA zugegen sind, ausschließlich die zu untersuchenden DNA Fragmente selektiv erzeugt werden, sofern sich diese hinsichtlich ihres Methylierungsstatus in einer CpG Position von der Hintergrund DNA unterscheiden.

25 Stand der Technik ist es nun, aus dem Nachweis eines solchen zu untersuchenden DNA-Moleküls auf den Methylierungszustand oder das Vorliegen einer zu untersuchenden DNA rückzuschließen, was wiederum eine Diagnose beispielsweise einer Tumorerkrankung in Patienten prinzipiell erlaubt, da es bekannt ist, das beispielsweise die

30 Serum DNA-Konzentration sich in Tumorpatienten zum Teil drastisch erhöht. Nur die von den Tumoren stammende DNA soll dann neben der Hintergrund-DNA nachgewiesen werden. Prinzipiell vergleichbar ist die Analyse von DNA in anderen Körperflüssigkeiten.

35

Stand der Technik ist wiederum ein von Epigenomics entwickeltes Verfahren, welches zu untersuchende DNA und Hintergrund-DNA nach Bisulfit-Behandlung gleichermaßen amplifiziert und dann die im Fragment enthaltenen ehemaligen CpG Positionen durch Hybridisierungstechniken untersucht, alternativ mittels MiniSequenzierung oder anderen gängigen Verfahren. Dies hat den Vorteil, dass man ein quantitatives Bild bezüglich der untersuchten Methylierungspositionen erhält, d. h. es erfolgt die Bestimmung des Methylierungsgrades einer Vielzahl von Positionen, was z. B. bei soliden Tumoren eine sehr genau Klassifizierung ermöglicht. Der Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass sie in den Fällen, in denen die Hintergrund-DNA stark überwiegt, keine genau Aussage liefern kann, da diese ja genau wie die zu untersuchende DNA amplifiziert wird und beide im Gemisch analysiert werden. Dieses Problem existiert nicht bei der Analyse von soliden Tumoren, wo man das zu untersuchende Material gezielt auswählen kann, es kann jedoch die Analyse von beispielsweise Serum-DNA erschweren.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Verfahren zu schaffen, welches die Nachteile des Standes der Technik überwindet.

Die Aufgabe wird durch ein Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierung in DNA-Proben gelöst, wobei man die folgenden Schritte ausführt:

a) man behandelt eine genomische DNA-Probe derart, dass die nicht methylierten Cytosinbasen in Uracil umgewandelt werden, während die 5-Methylcytosinbasen unverändert bleiben;

b) man amplifiziert die chemisch behandelte DNA-Probe unter Verwendung von mindestens 2 Paaren von im wesentlichen komplementären Sondenoligonukleotiden sowie einer Ligase und

c) man analysiert die Amplifikate und schließt aus dem Vorliegen eines Amplifikates auf den Methylierungsstatus in der zu untersuchenden DNA.

5 Dabei ist es bevorzugt, dass im zweiten Schritt die zu untersuchende DNA gegenüber der sequenzhomologen Hintergrund-DNA als Templat bevorzugt wird.

10 Es ist ferner bevorzugt, dass man aus der Analyse weiterer Positionen in dem Amplifikat auf den Methylierungsstatus in der zu untersuchenden DNA schliesst.

15 Besonders bevorzugt ist das erfindungsgemäße Verfahren, wobei in Schritt b) die Sondenolignukleotide dann an ein Templat hybridisieren, wenn die von diesen abgedeckten CpG Positionen in der genomischen DNA-Probe (bzw. der zu untersuchenden DNA) methyliert vorlagen und wobei die gleichen Sondenolignukleotide an Template, die an diesen Positionen ganz oder teilweise unmethyliert vorlagen, in
20 wesentlich geringerem Maße hybridisieren.

25 Ganz besonders bevorzugt ist es, wobei in Schritt b) die Sondenolignukleotide dann an ein Templat hybridisieren, wenn die von diesen abgedeckten CpG Positionen in der genomischen DNA-Probe (bzw. der zu untersuchenden DNA) unmethyliert vorlagen und wobei die gleichen Sondenolignukleotide an Template, die an diesen Positionen ganz oder teilweise methyliert vorlagen, in wesentlich geringerem Maße hybridisieren.

30 Es ist ferner besonders bevorzugt, dass Schritt b) im Detail wie folgt ausgeführt wird:

35 a) die Sondenoligonukleotide, welche an benachbarten Positionen auf dem Templat hybridisierten, werden durch Ligation miteinander verknüpft,

- b) die verknüpften Sondenoligonukleotide werden dehybridisiert,
- c) die zu den verknüpften Sondenoligonukleotiden komplementären Sondenoligonukleotide hybridisieren an die bereits verknüpften Sondenoligonukleotide und werden durch Ligation ihrerseits verknüpft und
- d) die verknüpften Sondenoligonukleotide dienen als Template für weitere Ligationsschritte, so dass eine weitere Vermehrung der verknüpften Sondenoligonukleotide erfolgt.

Es ist auch erfindungsgemäß bevorzugt, dass zumindest eines des Sondenoligonukleotide am 5'-Ende eine Phosphatgruppe trägt.

Weiterhin ist bevorzugt, dass zumindest eines der Sondenolignukleotide mit einer nachweisbaren Markierung versehen ist, insbesondere mit einer durch Fluoreszenz nachweisbaren Markierung versehen ist. Dabei ist es besonders bevorzugt, dass mindestens zwei Sondenoligonukleotide mit Markierungen versehen sind, wobei diese ihre Eigenschaften in Abhängigkeit von ihrem Abstand zueinander ändern. Insbesondere bevorzugt ist dabei, dass die Sondenoligonukleotide mindestens eine Fluoreszenzmarkierung tragen. Bevorzugt ist dabei ferner, dass die Sondenmoleküle die Amplifikation entweder durch eine Zunahme oder eine Abnahme der Fluoreszenz anzeigen. Insbesondere ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass man die Zunahme oder Abnahme der Fluoreszenz auch direkt zur Analyse verwendet und aus dem veränderten Fluorenzenzsignal auf einen Methylierungszustand der zu untersuchenden DNA schließt.

Besonders bevorzugt ist es, dass die Hintergrund-DNA in 100 facher Konzentration im Vergleich zur zu untersuchenden DNA vorliegt. Bevorzugt it ferner, dass die Hinter-

grund-DNA in 1000 facher Konzentration im Vergleich zur zu untersuchenden DNA vorliegt.

5 Erfindungsgemäß bevorzugt ist auch, dass man die Proben DNA aus Serum oder anderen Körperflüssigkeiten eines Individuums gewinnt. Erfindungsgemäß ist auch bevorzugt, dass man die Proben DNA aus Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Serum, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin einbettetem Gewebe, beispielsweise Gewebe von 10 Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologischen Objektträgern und allen möglichen Kombinationen hiervon gewinnt.

15 Bevorzugt ist erfindungsgemäß ferner ein Verfahren, bei dem man Schritt a) mit einem Bisulfit (=Disulfit, Hydrogensulfit) durchführt. Dabei ist bevorzugt, dass die chemische Behandlung nach Einbetten der DNA in Agarose erfolgt. Dabei ist erfindungsgemäß weiterhin bevorzugt, dass bei der chemischen Behandlung ein die DNA-Duplex denaturierendes Reagenz und/oder ein Radikalfänger zugegen 20 ist.

Es ist ferner bevorzugt, dass die Analyse Schritt c) mittels Hybridisierung an Oligomer-Arrays erfolgt, wobei Oligomere Nukleinsäuren oder in ihren Hybridisierungseigenschaften ähnliche Moleküle wie PNAs sein können. 25

Bevorzugt ist erfindungsgemäß auch, dass die Analyse in Schritt c) mittels Längenmessung der amplifizierten zu 30 untersuchenden DNA erfolgt, wobei Methoden zur Längenmessung Gelelektrophorese, Kapillargelelektrophorese, Chromatographie (z.B. HPLC), Massenspektrometrie und andere geeignete Methoden umfassen.

35 Weiterhin ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass die Analyse gemäß Schritt c) mittels Sequenzierung erfolgt, wobei Me-

thoden zur Sequenzierung die Sanger-Methode, Maxam-Gilbert-Methode und andere Methoden wie Sequencing by Hybridisation (SBH) umfassen.

5 Bevorzugt ist ferner, dass man aus dem Methylierungsstatus an den verschiedenen untersuchten CpG Positionen auf das Vorliegen einer Erkrankung oder eines anderen medizinischen Zustandes des Patienten schließt.

10 Erfindungsgemäß ist bevorzugt, dass die Amplifikate selbst für die Detektion mit einer nachweisbaren Markierung versehen sind. Besonders bevorzugt ist dabei, dass die Markierungen Fluoreszenzmarkierungen sind. Bevorzugt ist dabei auch, dass die Markierungen Radionuklide sind.
15 Ganz besonders ist erfindungsgemäß dabei bevorzugt, dass die Markierungen ablösbare Massenmarkierungen sind, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden. Insbesondere bevorzugt ist aber auch, dass die Amplifikate insgesamt im Massenspektrometer nachgewiesen werden und somit
20 durch ihre Masse eindeutig charakterisiert sind.

Weiterhin ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass zusätzlich zu den Sondenoligonukleotiden ein Blockeroligonukleotid eingesetzt wird, welches bevorzugt an die Hintergrund-DNA
25 bindet und die Hybridisierung der Sondenoligonukleotide an die Hintergrund-DNA behindert. Dabei ist besonders bevorzugt, dass zwei zueinander komplementäre Blockeroligonukleotide (oder Blocker-PNAs, allgemein Blockermoleküle) verwendet werden. Weiterhin ist
30 insbesondere bevorzugt, dass die Blockermoleküle bevorzugt an Templatstränge binden, die in ihrer Sequenz einer methyliert vorliegenden DNA nach Behandlung gemäß Schritt a) entsprechen. Dabei ist auch bevorzugt, dass die Blockermoleküle bevorzugt an Templatstränge binden, die
35 in ihrer Sequenz einer unmethyliert vorliegenden DNA nach Behandlung gemäß Schritt a) entsprechen. Insbesondere ist erfindungsgemäß auch bevorzugt, dass die Blockermoleküle

vorzugt, dass die Blockermoleküle an mehrere CpG Positionen in der Templat-DNA binden oder auch dass die Blockermoleküle an mehrere TpG oder CpA Positionen in der Templat-DNA binden. Dabei ist erfindungsgemäß weiterhin
5 bevorzugt, dass die Blockeroligonukleotide an ihrem 3'-Ende modifiziert sind und von einer Polymerase mit Nukleaseaktivität nicht wesentlich abgebaut werden können.

- 10 Erfindungsgemäß bevorzugt ist ein Verfahren, wobei Schritt b) im Detail wie folgt ausgeführt wird:
- a) die Sondenoligonukleotide (Sonde), hybridisieren derart an Positionen auf dem Templatstrang, dass zwischen dem 3'-Ende der ersten Sonde und dem 5'-Ende der zweiten
15 Sonde eine Lücke von mindestens einer Base verbleibt,
 - b) das 3'-Ende der ersten Sonde wird durch eine Polymerasereaktion verlängert, wobei zu dem Templatstrang jeweils komplementäre Nukleotide eingebaut werden,
 - c) die verlängerte erste Sonde wird mit der verlängerten zweiten Sonde durch Ligation verknüpft,
 - 20 d) die verknüpften Sondenoligonukleotide werden dehybridisiert,
 - e) die zu den verknüpften Sondenoligonukleotiden komplementären Sondenoligonukleotide hybridisieren an die bereits verknüpften Sondenoligonukleotide und werden
25 durch Ligation ihrerseits verknüpft und
 - f) die verknüpften Sondenoligonukleotide dienen als Template für weitere Ligationsschritte, so dass eine weitere Vermehrung der verknüpften Sondenoligonukleotide erfolgt. Dabei ist bevorzugt, dass auch Schritt e) analog
30 den Schritten a) - c) ausgeführt wird. Bevorzugt ist dabei, dass eine hitzestabile Polymerase verwendet wird.

Insbesondere ist erfindungsgemäß auch bevorzugt, dass eine
35 hitzestabile Ligase verwendet wird.

Weiterhin ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass mehrere Sätze von Oligonukleotidsonden für mehrere Gruppen von Methylierungspositionen eingesetzt werden und damit eine Multiplexierung des Assay erreicht wird.

5

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Verfahrens zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion. Bevorzugt ist dabei die Verwendung eines erfindungsgemäßen Verfahrens zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.

30

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Kit, bestehend aus einem Bisulfit enthaltenen Reagenz, markierten Oligonukleotidsonden, einer bevorzugt thermostabilen Ligase und Puffern sowie optional einer Anleitung zur Durchführung eines erfindungsgemäßen Assays.

35

Die erfindungsgemässe Aufgabe, ein sensitives Verfahren zur Methylierungsanalyse bereitzustellen, welches Nachteile des Standes der Technik überwindet, wird dadurch gelöst, dass ein Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierung in DNA-Proben geschaffen wird bei dem
5 dass man die folgenden Schritte ausführt:

1. Man behandelt eine genomische DNA-Probe derart, dass die nicht methylierten Cytosinbasen in Uracil umgewandelt
10 werden, während die 5-Methylcytosinbasen unverändert bleiben,

2. man amplifiziert die chemisch behandelte DNA-Probe unter Verwendung von mindestens 2 Paaren von im wesentlichen komplementären Sondenoligonukleotiden sowie einer
15 Ligase, und

3. man analysiert die Amplifikate und schließt aus dem Vorliegen eines Amplifikates auf den Methylierungsstatus in der zu untersuchenden DNA.

20 Erfindungsgemäss bevorzugt ist es, dass im zweiten Schritt die zu untersuchende DNA gegenüber der Hintergrund-DNA als Templat bevorzugt wird.

Weiterhin ist es erfindungsgemäss bevorzugt, dass man
25 aus der Analyse weiterer Positionen in dem Amplifikat auf den Methylierungsstatus in der zu untersuchenden DNA schliesst.

Der 2. Schritt des Verfahrens wird besonders bevorzugt
30 wie folgt ausgeführt:

a) die Sondenolignukleotide hybridisieren an das Templat dann, wenn die von diesen abgedeckten CpG Positionen in der genomischen DNA-Probe (bzw. der zu untersuchenden
35 DNA) methyliert vorlagen und an Templaten, die an diesen Positionen ganz oder teilweise unmethyliert vorlagen,

findet die Hybridisierung der Sondenoligonukleotide in wesentlich geringerem Maße statt,

b) die Sondenoligonukleotide, welche an benachbarten Positionen auf dem Templat hybridisierten, werden durch Ligation miteinander verknüpft,

c) die verknüpften Sondenoligonukleotide werden dehybridisiert,

d) die zu den verknüpften Sondenoligonukleotiden komplementären Sondenoligonukleotide hybridisieren an die bereits verknüpften Sondenoligonukleotide und werden durch Ligation ihrerseits verknüpft und

e) die verknüpften Sondenoligonukleotide dienen als Template für weitere Ligationsschritte, so dass eine exponentielle Vermehrung der verknüpften Sondenoligonukleotide erfolgt.

Ebenfalls ist es bevorzugt, den 2. Verfahrensschritt wie folgt auszuführen:

a) die Sondenolignukleotide hybridisieren an das Templat dann, wenn die von diesen abgedeckten CpG Positionen in der genomischen DNA-Probe (bzw. der zu untersuchenden DNA) unmethyliert vorlagen und an Templaten, die an diesen Positionen ganz oder teilweise methyliert vorlagen, findet die Hybridisierung der Sondenoligonukleotide in wesentlich geringerem Maße statt,

b) die Sondenoligonukleotide, welche an benachbarten Positionen auf dem Templat hybridisierten, werden durch Ligation miteinander verknüpft,

c) die verknüpften Sondenoligonukleotide werden dehybridisiert,

d) die zu den verknüpften Sondenoligonukleotiden komplementären Sondenoligonukleotide hybridisieren an die bereits verknüpften Sondenoligonukleotide und werden durch Ligation ihrerseits verknüpft und

e) die verknüpften Sondenoligonukleotide dienen als Template für weitere Ligationsschritte, so dass eine exponentielle Vermehrung der verknüpften Sondenoligonukleotide erfolgt.

5

Zusammenfassend ist zu betonen, dass der methylierungs-sensitive Schritt die benachbarte methylierungssensitive (auf der entsprechenden Bisulfit-behandelten DNA) Hybridisierung zweier Sondenoligonukleotide im Schritt a) ist. Hat eine Ligation stattgefunden, so erfolgt eine exponentielle Amplifikation dieser verknüpften Oligonukleotide.

10

15

Damit diese Ligation stattfinden kann, sollte eines der Sondenoligonukleotide (eines in jedem im wesentlichen komplementären Paar) eine endständige Phosphatgruppe tragen. Ansonsten muss diese in einem separaten Phosphorylierungsschritt eingefügt werden.

20

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass man die Proben DNA aus Serum oder anderen Körperflüssigkeiten eines Individuums gewinnt.

25

Es ist weiterhin erfindungsgemäß bevorzugt, dass man die Proben DNA aus Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Serum, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetem Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologischen Objektträgern und allen möglichen Kombinationen hiervon gewinnt.

30

Weiterhin ist bevorzugt, dass man aus dem Methylierungsgrad an den verschiedenen untersuchten CpG Positionen auf das Vorliegen einer Erkrankung oder eines anderen medizinischen Zustandes des Patienten schließt.

35

Es ist ganz besonders erfindungsgemäß bevorzugt, dass man die chemische Behandlung mit einem Bisulfit (=Disulfit, Hydrogensulfit) durchführt. Bevorzugt ist es auch, dass die chemische Behandlung nach Einbetten der DNA in Agarose erfolgt. Es ist auch und weiterhin bevorzugt, dass bei der chemischen Behandlung ein die DNA-Duplex denaturierendes Reagenz und/oder ein Radikalfänger zugegen ist.

Ferner ist es auch bevorzugt, dass Reportermoleküle die Amplifikation entweder durch eine Zunahme oder eine Abnahme der Fluoreszenz anzeigen. Dabei ist es besonders vorteilhaft, dass man die Zunahme oder Abnahme der Fluoreszenz auch direkt zur Analyse verwendet und aus dem Fluoreszenzsignal auf einen Methylierungszustand der zu analysierenden DNA schließt.

Dies kann wiederum auf verschiedenen, dem Fachmann bekannten Wegen erreicht werden. Zum einen ist es möglich, die benachbart bindenden Sondenoligonukleotide mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen zu versehen.

Durch Fluoreszenzenergietransfer (FRET) kann entweder der eine Farbstoff, sofern er sich in räumlicher Nähe zu dem anderen befindet und der andere angeregt wird, zu Fluoreszenz angeregt werden. Auch ist es andererseits möglich, dass ein Farbstoff die Fluoreszenz des anderen unterdrückt, wenn er zu diesem räumlich benachbart ist (Quenching). Beide Methoden können zur Sichtbarmachung des Fortschritts der MLA eingesetzt werden. Sinngemäß werden die Methoden bei der PCR als Taqman oder Lightcycler-Assays eingesetzt.

Bevorzugt ist es erfindungsgemäß ferner, dass die Hintergrund-DNA in 100 facher Konzentration im Vergleich zur zu untersuchenden DNA vorliegt. Weiterhin ist bevorzugt,

dass die Hintergrund-DNA in 1000 facher Konzentration im Vergleich zur zu untersuchenden DNA vorliegt.

5 Bevorzugt ist es ferner, dass die Analyse, oder gegebenenfalls die weitere Analyse mittels Hybridisierung an Oligomer-Arrays erfolgt, wobei Oligomere Nukleinsäuren oder in ihren Hybridisierungseigenschaften ähnliche Moleküle wie PNAs (Peptide Nucleic Acids) sein können.

10 Auch ist es erfindungsgemäß bevorzugt, dass die Analyse, oder gegebenenfalls die weitere Analyse durch Längenmessung der amplifizierten verknüpften Sondenoligonukleotide erfolgt, wobei Methoden zur Längenmessung Gelelektrophorese, Kapillargelelektrophorese, Chromatographie (z.B.
15 HPLC), Massenspektrometrie und andere geeignete Methoden umfassen.

Vorteilhaft ist es, dass die Amplifikate selbst für die Detektion mit einer nachweisbaren Markierung versehen
20 sind. Weiterhin vorteilhaft ist es, dass die Markierungen Fluoreszenzmarkierungen sind. oder/und dass die Markierungen Radionuklide sind oder/und dass die Markierungen ablösbare Massenmarkierungen sind, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden.

25 Weiterhin ist es bevorzugt, dass die Amplifikate Markierungen wie beispielsweise Biotin tragen, so dass sie selektiv an Festphasen gebunden werden können. In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens werden eine
30 mit Biotin markierte Oligonukleotidsonde sowie eine fluoreszenzmarkierte Oligonucleotidsonde miteinander verknüpft und anschliessend die Produkte an beispielsweise Streptavidin gebunden. Ein Fluoreszenzsignal der gebundenen Spezies kann demnach nur gemessen werden, wenn eine
35 Verknüpfung stattfand. Das Fluoreszenzsignal ist in durch

die Methode gegebenen Grenzen proportional zu der Anzahl der stattgefundenen Ligationen.

5 Erfindungsgemäß ist es auch, dass die Amplifikate insgesamt im Massenspektrometer nachgewiesen werden und somit durch ihre Masse eindeutig charakterisiert sind.

10 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Verfahrens zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien an-
15 gehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes;
20 Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut,
25 der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.

30 Vorteilhaft ist auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Verfahrens zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.

35 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Kit, bestehend aus einem Bisulfit enthaltenen Reagenz, markierten Oligonukleotidsonden, einer bevorzugt thermosta-

bilen Ligase und Puffern sowie optional einer Anleitung zur Durchführung eines erfindungsgemäßen Assays

Das bevorzugte Verfahren besteht aus mehreren Schritten,
5 die sich wie folgt zusammenfassen lassen:

Zuerst werden dem Patienten eine DNA Serum und/oder andere Körperflüssigkeiten entnommen und die darin befindliche DNA wenn erforderlich isoliert. Anschliessend wird im
10 eine chemische Behandlung, bevorzugt mit einem Bisulfit (=Hydrogensulfit, Disulfit) durchgeführt, wobei beispielsweise alle nicht methylierten Cytosinbasen in Uracil umgewandelt werden, die methylierten Cytosinbasen (5-Methylcytosin) jedoch unverändert bleiben. Im zweiten
15 Verfahrensschritt wird nun eine amplifizierende Ligation durchgeführt, bei der bevorzugt die zu untersuchende DNA amplifiziert wird, nicht aber oder nur in geringerem Maße die Hintergrund-DNA. In jedem Fall erfolgt die Amplifikation aber in Abhängigkeit davon, ob ein bestimmter Methylierungsstatus auf zumindest einem DNA Fragment in der
20 Probe vorliegt, wie beispielsweise bevorzugt alle CpG Positionen aufmethyliert in den Positionen an die Sondenoligonukleotide binden. Im folgenden, dritten Schritt werden nun die amplifizierten Fragmente identifiziert und
25 auf den Methylierungsstatus in der genomischen DNA-Probe geschlossen. Bevorzugt wird daraus auf das Vorliegen einer Erkrankung oder eines anderen medizinischen Zustandes des Patienten geschlossen.

30 Bevorzugt wird die in dem Verfahren eingesetzte genomische DNA aus einer DNA-Probe erhalten, wobei Quellen für DNA z. B. Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Serum, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetes Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere,
35 Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologische Objektträger und alle möglichen Kombinationen hier-

von umfassen. Besonders bevorzugt ist die Isolierung von DNA aus Körperflüssigkeiten eines Individuums, wie Sputum, Serum, Plasma, Vollblut, Urin oder Ejakulat.

5 Es erfolgt in einigen Fällen vor der Bisulfit-Behandlung eine Aufreinigung oder Aufkonzentration der DNA, um eine Störung der Bisulfit-Reaktion und/oder der nachfolgenden PCR durch ein zu hohes Maß an Verunreinigungen zu vermeiden. Es ist jedoch bekannt, dass beispielsweise eine PCR
10 aus Gewebe nach Behandlung beispielsweise mit Proteinase K ohne weitere Aufreinigung erfolgen kann, und dies gilt sinngemäß auch für die Bisulfit-Behandlung und nachfolgende PCR.

15 Die chemische Behandlung wird bevorzugt durch Behandlung mit einem Bisulfit (=Hydrosulfit, Disulfit), wiederum bevorzugt Natriumbisulfit (weniger geeignet ist Ammoniumbisulfit) durchgeführt. Entweder erfolgt die Reaktion nach einer publizierten Variante, bevorzugt ist hier die
20 Einbettung der DNA in Agarose, um die DNA während der Behandlung in einzelsträngigen Zustand zu halten, oder aber nach einer neuen Variante durch Behandlung in Gegenwart eines Radikalfängers und eines denaturierenden Reagenzes, bevorzugt ein Oligethylenglykoldialkylether oder bei-
25 spielsweise Dioxan. Vor der PCR Reaktion werden die Reagenzien entweder durch Waschen im Falle der Agarosemethode oder einem DNA-Aufreinigungsverfahren (Stand der Technik, Fällung oder Bindung an eine Festphase, Membran) entfernt oder aber einfach durch Verdünnung in einen Kon-
30 zentrationsbereich gebracht, der die PCR nicht mehr signifikant beeinflusst.

Wesentlich für den zweiten Verfahrensschritt ist es nun, dass die zu untersuchenden Methylierungspositionen ausge-
35 wählt werden und geeignete Sondenoligonukleotide gewählt werden, die die selektive Amplifikation der zu untersu-

chenden DNA erlauben. Die Auswahl der Positionen erfolgt entweder nach der Prämisse, dass sie sich zwischen Hintergrund-DNA und zu untersuchender DNA hinsichtlich ihrer Methylierung so sehr wie möglich unterscheiden sollten, oder aber das Vorliegen einer solchen Methylierung in einem großen Teil der Proben DNA bereits auf eine Erkrankung oder einen bestimmten anderen medizinischen Zustand eines Individuums schließen lässt. Dazu werden zunächst die Methylierungsprofile der jeweils in Frage kommenden Abschnitte eines Gens sowohl für die zu untersuchende DNA aus erkrankten Individuen als auch für die Hintergrund-DNA aus gesunden Individuen bestimmt. Diejenigen Positionen, die die größten Unterschiede zwischen zu untersuchender DNA und Hintergrund-DNA (beispielsweise im Serum) aufweisen, werden als zu untersuchende Positionen ausgewählt. Solche Positionen sind für eine Vielzahl von Genen bereits bekannt, beispielsweise für GSTpi, für HIC-1 und MGMT (von Wronski MA, Harris LC, Tano K, Mitra S, Bigner DD, Brent TP. (1992) Cytosine methylation and suppression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase expression in human rhabdomyosarcoma cell lines and xenografts. *Oncol Res.*;4(4-5):167-74; Esteller M, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, Watkins DN, Issa JP, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG. (2000), Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* May 1;60(9):2368-71).

Es ist offensichtlich, dass auch in diesem Fall das Entstehen eines Amplifikates von hinreichender Aussagekraft sein kann, sofern man, wie auch bei der MSP, die Situation vorliegen hat, dass die Gruppe von CpG-Positionen praktisch zu 100% beispielsweise in der Hintergrund-DNA unmethyliert vorliegt, jedoch in der zu untersuchenden DNA (die dann nur in erkrankten Individuen auftritt) me-

thyliert vorliegt. Verwendet man nun in der MLA Sondenoligonukleotide, die bevorzugt an die Sequenz binden, welche in der Bisulfit-Behandlung aus nicht methylierter Hintergrund-DNA entsteht, so entsteht nur dann ein Ligationssprodukt, wenn wenigstens eine geringe Menge an zu untersuchender DNA überhaupt vorhanden ist.

Wiederum besonders bevorzugt ist es, das Verfahren für mehrere Methylierungspositionen gleichzeitig in einem Ansatz multiplexiert auszuführen. In diesem Fall werden beispielsweise bevorzugt 4 verschiedene Gruppen von CpG Positionen auf ihre Methylierung hin untersucht. Handelsübliche Geräte für die Realtime-PCR (z.B. ABI Prism) können 4 Fluoreszenzfarbstoffe unterscheiden und eignen sich damit sehr gut für die Durchführung 4fach multiplexierter MLA assays.

Im einfachsten Fall werden nun die entstandenen Amplifikate direkt nachgewiesen. Dazu kommen alle möglichen bekannten molekularbiologischen Verfahren in Frage, wie Gelelektrophorese, Sequenzierung, Flüssigchromatographie oder Hybridisierungen.

Detektionstechniken, die sich ebenfalls für den Nachweis der Amplifikate eignen, sind die Hybridisierung an Oligomerarrays und beispielsweise Primer-Extension (MiniSequenzierung) Reaktionen. Die Hybridisierung an Oligomerarrays kann ohne weitere Veränderung von Protokollen gegenüber dem nächstliegenden Stand der Technik verwendet werden (Olek A, Olek S, Walter J; WO 99/28498 A1). Besonders bevorzugt ist in diesem Fall das Amplifikat oder die Amplifikate fluoreszent oder radioaktiv oder mit ablösbaren Massentags markiert, so dass sich nach der Hybridisierung die an die beiden Oligonukleotide eines Paares gebundenen Fragmente anhand dieser Markierung nachweisen und Quantifizieren lassen. Auf einem solchen Oligomer-

Array lassen sich eine Vielzahl von Amplifikaten gleichzeitig nachweisen, so dass ein solches Verfahren sich vornehmlich für die Analyse hochgradig multiplexierter MLAs eignen dürfte. Es ist sinnvoll und bevorzugt, dass
5 der Array auch nicht an CpG Positionen bindende Oligomere zur Kontrolle des Experimentes enthält. Diese binden an Ligationsprodukte nicht methylierungssensitiver Sondenoligonukleotide, die zur Qualitätskontrolle und/oder Quantifizierung der Proben DNA dienen.

10 Eine besonders bevorzugte Variante des Verfahrens ist jedoch die Verwendung von Taqman oder Lightcycler-Technologievarianten zur Real-time Detektion der Amplifikation. Diese vom Methylierungsstatus abhängige Fluoreszenzänderung während der Amplifikation kann durch zahlreiche Methoden erzielt werden. Zum einen können Sondenoligonukleotide verwendet werden, die spezifisch entweder
15 an eine Sequenz binden, die durch chemische Behandlung aus einer an der entsprechenden Position unmethylierten DNA hervorgegangen ist, oder aber entsprechend an einer Sequenz, die durch chemische Behandlung aus einer an der entsprechenden Position methylierten DNA hervorgegangen ist. Für die Ligation müssen diese Sonden, wie oben ausgeführt, zueinander angrenzend hybridisieren. Diese Sonden
20 sind besonders bevorzugt mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen versehen, einem Quencherfarbstoff und einem als Marker dienenden Fluoreszenzfarbstoff. Findet nun eine MLA-Reaktion mit der zu untersuchenden DNA als Templat statt, werden der Quencherfarbstoff und der als
25 Marker dienende Fluoreszenzfarbstoff durch Ligation der beiden Sonden miteinander in Kontakt gebracht. Dadurch wird eine Abnahme der Fluoreszenz des Markerfarbstoffs unmittelbar sichtbar.

35 Bevorzugt werden verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlichen Emissionswellenlängen an mehreren Son-

den zusammen mit verschiedenen Quenchersonden eingesetzt, um eine Unterscheidbarkeit der Sonden und damit eine Multiplexierung zu erreichen.

5 Ist eine genauere Quantifizierung des Methylierungsgrades einer Methylierungsposition wünschenswert, so können bevorzugt auch zwei mit einander konkurrierende Sondenpaare mit unterschiedlichen Farbstoffen eingesetzt werden, wobei eine wiederum im Fall einer unmethylierten Position
10 in der zu untersuchenden DNA, die andere umgekehrt im Falle einer methylierten Position bevorzugt hybridisiert. Aus dem Verhältnis der Fluoreszenzzunahmen für die beiden Farbstoffe lässt sich dann wiederum auf den Methylierungsgrad der untersuchten Position schließen.

15 Ein grundsätzlich anderes Verfahren, bei dem jedoch auch während der PCR eine Fluoreszenzänderung erfolgt, ist gegenwärtig als LightCyclertm Technologie bekannt. Dabei wird ausgenutzt, dass ein Fluoreszenz Resonanz Energietransfer (FRET) zwischen zwei Farbstoffen nur erfolgen
20 kann, wenn diese sich in unmittelbarer Nähe, das heißt 1-5 Nukleotide voneinander entfernt befinden. Nur dann kann der zweite Farbstoff von der Emission des ersten Farbstoffes angeregt werden und dann seinerseits Licht einer
25 anderen Wellenlänge emittieren, das dann detektiert wird. Dieses Verfahren lässt sich analog auch für die MLA anwenden, nur dass in diesem Fall die beiden Sonden nach der Ligation verknüpft sind und sich in dem nachfolgenden Denaturierungsschritt nicht mehr trennen.

30 Im vorliegenden Fall der Methylierungsanalyse erfolgt eine Hybridisierung einer fluoreszenzmarkierten Sonde an die betreffende chemisch behandelte DNA an einer CpG-Position, und die Bindung dieser Sonde hängt wiederum davon ab, ob die zu untersuchende DNA an dieser Position
35 methyliert oder unmethyliert vorlag. Unmittelbar benach-

bart zu dieser Sonde bindet eine weitere Sonde mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff. Diese Bindung erfolgt bevorzugt wiederum methylierungsabhängig, wenn in dem betreffenden Sequenzabschnitt eine weitere methylierbare Position vorliegt. Während der Amplifikation wird nun die DNA vermehrt, weshalb immer mehr fluoreszenzmarkierte Sonden benachbart an die betreffende Position hybridisieren und dabei mit einander verknüpft werden, sofern diese den dafür erforderlichen Methylierungszustand aufwies, und daher sich ein zunehmender FRET gemessen wird.

Besonders bevorzugt hybridisiert jede der verwendeten Oligonukleotidsonden an eine Sequenz, die vor der Behandlung gemäß Schritt 1 des erfindungsgemässen Verfahrens zumindest zwei CpG Dinukleotide enthielt. Wiederum besonders bevorzugt ist es, das Design der Sonden derart auszuführen, dass möglichst viele solcher CG Positionen in dem Sequenzabschnitt liegen, an den die beiden Oligonukleotidsonden hybridisieren.

Auch bei diesem Verfahren erfolgt bevorzugt eine Multiplexierung mit mehreren verschiedenen fluoreszenzmarkierten Sonden. Dabei ist es wiederum besonders bevorzugt, dass eine der benachbart hybridisierenden Sonden jeweils eine bestimmte Markierung enthält, wie zum Beispiel einen Quencherfarbstoff, und die andere je nach Sequenz einen andere, für die jeweilige Sequenz spezifische Markierung, wie beispielsweise einen Fluoreszenzfarbstoff. So ist es beispielsweise möglich und bevorzugt, dass in einem multiplexierten Assay nur ein Quencherfarbstoff zum Einsatz kommt, jedoch vier verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe.

Es ist möglich, zwei Fluoreszenzfarbstoffe zu verwenden, wobei der eine die Fluoreszenz des anderen anregen kann, oder aber einen Fluoreszenzfarbstoff und einen Quencher-

farbstoff, welcher die Fluoreszenz des anderen Farbstoffes entsprechend auslöschen kann.

5 Beide Verfahren unterscheiden sich im Ergebnis hauptsächlich darin, dass in einem Fall eine Abnahme, im anderen Fall eine Zunahme der Fluoreszenz während der Amplifikation gemessen wird.

10 In einer weiteren besonders bevorzugten Variante des Verfahrens findet zusätzlich zu dem Ligationsschritt eine Verlängerung zumindest einer Oligonukleotidsonde statt, was die Spezifität des Amplifikationsverfahrens weiter erhöht. In diesem Fall hybridisieren die Oligonukleotidsonden nicht unmittelbar benachbart, sondern in einem ge-
15 ringen Abstand von besonders bevorzugt 1-10 Basen voneinander entfernt. Diese Lücke wird durch eine Polymerase-reaktion mit Nukleotiden ausgefüllt. Diese Verlängerung mittels einer zusätzlich eingesetzten Polymerase kann entweder methylierungsspezifisch erfolgen, wenn in der
20 noch nicht behandelten DNA an der betreffenden Position ein CpG Dinukleotid vorliegt, oder lediglich die Sequenzspezifität erhöhen. Die Verlängerung erfolgt bevorzugt über entweder nur eine oder eine relativ geringe Anzahl von Basen, besonders bevorzugt zwischen 1 und 10 Ba-
25 sen. In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens grenzen die Oligonukleotidsonden unmittelbar an die zu untersuchende CG Position an. Besonders bevorzugt überlappt eine der Oligonukleotidsonden mit einer Base des CG Dinukleotids. Wiederum besonders bevorzugt ist es,
30 dass in dem Abschnitt zwischen den Oligonukleotidsonden, der durch die Primerverlängerung ausgefüllt wird, sich nur eine methylierbare Position befindet.

35 Eine Oligonukleotidsonde mit bekannter Sequenz von n Nucleotiden wird also mit einer hitzebeständigen Polymerase um höchstens die Anzahl von Nukleotiden verlängert, die

zwischen dem 3'-Ende der ersten Oligonukleotidsonde und dem 5'-Ende der zweiten hybridisierten Oligonukleotidsonde liegen. Bevorzugt trägt dabei zumindest ein Nukleotid eine nachweisbare Markierung. Diese nachweisbare Markierung kann wiederum besonders bevorzugt mit einer weiteren Markierung, die an eine der Oligonukleotidsonden gebunden ist, wechselwirken, so dass das Ausmaß des Einbaus des markierten Nukleotids gemessen werden kann. Diese Wechselwirkung ist besonders bevorzugt Fluoreszenz Resonanz-Energietransfer (FRET). In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens trägt daher entweder die erste Oligonukleotidsonde und/oder die zweite Oligonukleotidsonde eine nachweisbare Markierung. Die Art der Verlängerung hängt dabei bevorzugt vom Methylierungsstatus mindestens eines Cytosins in der genomischen DNA-Probe ab, oder aber von eventuell vorhandenen SNPs, Punktmutationen oder Deletionen, Insertionen und Inversionen.

In einer bevorzugten Variante des Verfahrens sind die eingesetzten Nukleotide terminierende und/oder kettenverlängernde Nukleotide. Dabei ist das terminierende Nukleotid bevorzugt ein 2',3'-Dideoxynukleotid und das kettenverlängernde Nukleotid ein 2'-Desoxynukleotid. Dabei wird besonders bevorzugt das terminierende Nukleotid eingebaut, welches auch keine nachfolgende Ligation erlaubt, wenn der für die Hintergrund-DNA typische Methylierungsstatus in dem jeweiligen Templatstrang vor der Behandlung gemäss Schritt 1 des Verfahrens vorlag. Ein kettenverlängerndes Nukleotid wird hingegen dann eingebaut, wenn der für die zu untersuchende DNA typische Methylierungsstatus in dem jeweiligen Templatstrang vor der Behandlung gemäss Schritt 1 des Verfahrens vorlag.

In einer weiteren besonders bevorzugten Variante des Verfahrens werden für die Amplifikation nicht alle vier Nukleotide eingesetzt, sondern nur maximal drei Nukleoti-

de, besonders bevorzugt entweder die Nukleotide dATP, dCTP und dTTP oder die Nukleotide dATP, dGTP und dTTP. Alternativ kann statt dTTP jeweils dUTP eingesetzt werden.

5

Ein Sequenzbeispiel für den Einsatz nur dreier Nukleotide ist in Figur 3 dargestellt.

10

Besonders bevorzugt ist bei der Kombination der Ligase-reaktion mit einem Polymeraseschritt mindestens eines der Oligonukleotide derart modifiziert, dass es am 3'-Ende von der Polymerase nicht verlängert werden kann. Das 3'-Ende liegt besonders bevorzugt mit einer Phosphatgruppe funktionalisiert oder 2'-3'-Dideoxy-modifiziert vor.

15

Besonders bevorzugt ist es wiederum, dass die eingesetzte Polymerase keine oder nur eine sehr geringe 5'-Exonukleaseaktivität aufweist. Besonders bevorzugt wird daher das Stoffel-Fragment der Taq-Polymerase verwendet.

20

In einer weiteren besonders bevorzugten Variante des Verfahrens wird zusätzlich zu den Oligonucleotidsonden mindestens ein Blocker-Oligonukleotid eingesetzt. Dieses Blocker-Oligonukleotid bindet bevorzugt an die Hintergrund-DNA und behindert die Ligasereaktion und/oder Primerverlängerung im Falle eines zusätzlichen Polymeraseschrittes.

25

In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens bindet ein Blocker-Oligonukleotid an Positionen, die auch von einem der Oligonukleotidsonden abgedeckt werden. In einer wiederum besonders bevorzugten Variante des Verfahrens bindet ein Blocker-Oligonukleotid an Positionen, die teilweise von der ersten Oligonukleotidsonde und teilweise von der zweiten Oligonukleotidsonde abgedeckt werden. In diesem Fall bindet ein Blocker-Oligonukleotid

30

35

unter anderem an die Position, an der sonst einer Ligati-
on der hybridisierten Sondenoligonukleotide stattfinden
könnte.

5 In einer weiteren besonders bevorzugten Variante des Ver-
fahrens binden Blocker-Oligonukleotide an die Positionen
zwischen den beiden hybridisierten Oligonukleotidsonden,
die ansonsten durch die Verlängerung der ersten Sonde
mittels einer Polymerasereaktion ausgefüllt werden könn-
10 te.

Besonders bevorzugt ist es bei dem Einsatz von Blocker-
Oligonukleotiden dass diese derart modifiziert vorliegen,
dass sie am 3'-Ende von der Polymerase nicht verlängert
15 werden können. Das 3'-Ende liegt besonders bevorzugt mit
einer Phosphatgruppe funktionalisiert oder 2'-3'-
Dideoxy-modifiziert vor. Besonders bevorzugt ist auch
der analoge Einsatz von PNA (Peptide Nucleic Acids) oder
anderen Nucleinsäureanaloga als Blockermoleküle.

20 Es ist ebenfalls bevorzugt, dass die Blocker durch die
5'-Exonukleaseaktivität einer eventuell eingesetzten Po-
lymerase nicht wesentlich abgebaut werden können. Dazu
können beispielsweise die 5'-Enden der Blocker modififi-
25 ziert vorliegen oder aber besonders bevorzugt eine oder
mehrere Phosphorothioatbrücken zum 5'-Ende des Blockero-
ligonukleotids hin vorliegen.

Besonders bevorzugt werden die Sondenoligonukleotide vor
30 ihrem Einsatz in der MLA phosphoryliert oder direkt mit-
tels herkömmlicher Oligonukleotidsynthese am 5'-Ende
phosphoryliert hergestellt. Besonders bevorzugt erfolgt
die Phosphorylierung der Sonden mittels Polynukleotid Ki-
nase und ATP. Die Phosphorylierung ist nur für die zweite
35 Oligonukleotidsonde jeweils erforderlich.

Zusammenfassend ist ein Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierung in DNA-Proben besonders bevorzugt, bei welchem die folgenden Schritte ausgeführt werden:

- 5 1. Man behandelt eine genomische DNA-Probe derart, dass die nicht methylierten Cytosinbasen in Uracil umgewandelt werden, während die 5-Methylcytosinbasen unverändert bleiben,
- 10 2. man amplifiziert die chemisch behandelte DNA-Probe unter Verwendung von mindestens 2 Paaren von im wesentlichen komplementären Sondenoligonukleotiden sowie einer Ligase, und
- 15 3. man analysiert die Amplifikate und schließt aus dem Vorliegen eines Amplifikates auf den Methylierungsstatus in der zu untersuchenden DNA.

In einer besonders bevorzugten Verfahrensvariante wird die Proben-DNA aus Serum oder anderen Körperflüssigkeiten eines Individuums gewonnen. Ebenfalls bevorzugt ist es,
20 dass die Proben-DNA aus Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Serum, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetem Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologischen Objektträgern und allen möglichen
25 Kombinationen hiervon gewonnen wird.

In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens wird die chemische Behandlung mit einem Bisulfit (=Disulfit, Hydrogensulfit) durchgeführt. Bevorzugt ist
30 es, die chemische Behandlung nach Einbetten der DNA in Agarose durchzuführen. Auch ist es bevorzugt, dass bei der chemischen Behandlung ein die DNA-Duplex denaturierendes Reagenz und/oder ein Radikalfänger zugegen ist.

Besonders bevorzugt wird für die Analyse ein Taqman-Assay durchgeführt. Ebenso ist es bevorzugt, einen LightCycler Assay (wie oben beschrieben) durchzuführen.

- 5 Besonders bevorzugt verfügen die zusätzlich zu den Primern verwendeten Oligonukleotide nicht über eine 3'-OH Funktion. Zudem tragen die Reporteroligonukleotide besonders bevorzugt mindestens eine Fluoreszenzmarkierung.
- 10 Es ist besonders bevorzugt, dass die Reportermoleküle die Amplifikation entweder durch eine Zunahme oder eine Abnahme der Fluoreszenz anzeigen und dass die Zunahme oder Abnahme der Fluoreszenz auch direkt zur Analyse verwendet wird und aus dem Fluoreszenzsignal auf einen Methylierungszustand der zu analysierenden DNA geschlossen wird.
- 15

Besonders bevorzugt ist auch ein Verfahren, bei dem die weitere Analyse durch Längenmessung der amplifizierten zu untersuchenden DNA erfolgt, wobei Methoden zur Längenmessung Gelelektrophorese, Kapillargelelektrophorese, Chromatographie (z.B. HPLC), Massenspektrometrie und andere geeignete Methoden umfassen.

20

Besonders bevorzugt ist auch ein Verfahren, bei dem die weitere Analyse durch Sequenzierung erfolgt, wobei Methoden zur Sequenzierung die Sanger-Methode, Maxam-Gilbert-Methode und andere Methoden wie Sequencing by Hybridisation (SBH) umfassen. Wiederum bevorzugt ist ein Verfahren, wobei die Sequenzierung (nach Sanger) für jede oder eine kleine Gruppe von CpG Positionen mit jeweils einem separaten Primeroligonukleotid ausgeführt wird und die Verlängerung der Primer nur eine oder einige wenige Basen ausmacht, und aus der Art der Primerverlängerung auf den Methylierungsstatus der betreffenden Positionen in der zu untersuchenden DNA geschlossen wird.

25

30

35

In einer besonders bevorzugten Verfahrensvariante wird aus dem Methylierungsgrad an den verschiedenen untersuchten CpG Positionen auf das Vorliegen einer Erkrankung oder eines anderen medizinischen Zustandes des Patienten geschlossen.

Besonders bevorzugt sind auch die Amplifikate selbst für die Detektion mit einer nachweisbaren Markierung versehen. Bei diesen Markierungen handelt es sich bevorzugt um Fluoreszenzmarkierungen, Radionuklide oder ablösbare Massenmarkierungen, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden.

Auch bevorzugt ist eine Verfahrensvariante, wobei die Amplifikate insgesamt im Massenspektrometer nachgewiesen werden und somit durch ihre Masse eindeutig charakterisiert sind.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines der beschriebenen Verfahren zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut,

der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.

- 5 Zudem bevorzugt ist die Verwendung eines der beschriebenen Verfahren zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung:

10

Beispiel 1:

Herstellung von nicht- und aufmethylierter DNA und Bisulphit-Behandlung

- 15 Für die Herstellung aufmethylierter DNA wurden humane genomische DNA mit S-Adenosylmethion und der CpG Methylase (SssI, New England Biolabs) nach Angaben des Herstellers behandelt. Die Herstellung nicht methylierter DNA als Referenz war für die nachfolgenden Beispiele nicht erforderlich, da die betreffenden Positionen in kommerziell erhältlicher humaner DNA (Promega) durchweg unmethyliert vorliegen. Die Bisulfit Behandlung wurde gemäss der publizierten Agarose Methode (Olek A, Oswald J, Walter J. A modified and improved method for bisulphate based cytosine methylation analysis. Nucleic Acids Res. 1996 DEC 20 15;24(24):5064-6) durchgeführt. Aufmethylierte und unbehandelte DNA wurde in gleichen Mengen (etwa 700 ng) in jeweils zwei verschiedenen, jedoch analog durchgeführten Bisulfitreaktionen eingesetzt.

30

Beispiel 2:

Die Sequenz GGGCGTTTTTTTGCGGTCGACGTTGGGGTGTA (SEQ-ID:1) (nach Bisulfit-Behandlung) wurde mittels MLA untersucht.

- 35 Diese Sequenz liegt vor, wenn die betreffenden Methylierungspositionen in der DNA-Probe methyliert vorlagen. Es

wurde die mit Sss1 und mit Bisulfit behandelte DNA-Probe des Beispiels 1 verwendet. Die Sondenoligonukleotide GCGTTTTTTTGC GG (SEQ-ID:2) und TCGACGTTTCGGGGT (SEQ-ID:3) sowie die dazu komplementären Sondenoligonukleotide CCGCAAAAAAACGCC (SEQ-ID:4) und ACCCCGAACGTCTGA (SEQ-ID:5) wurden verwendet, wobei die SEQ-ID:3 und SEQ-ID:4 jeweils mittels Polynucleotid Kinase zuvor am 5'-Ende phosphoryliert wurden. Für die Ligation wurden Bedingungen wie in WO 94/08047 beschrieben verwendet (40 Cyclen).

Die Ligationsprodukte wurden mittels Polyacrylamid-gelelektrophorese nachgewiesen.

Ein Kontrollexperiment mit nicht aufmethylierter Kontroll-DNA gemäß Beispiel 1 ergab hingegen kein nachweisbares Produkt.

Die MLA-Reaktion ist schematisch in Figur 1 dargestellt. Nach der Behandlung mit Bisulfit liegt die DNA einzelsträngig vor (1) und erlaubt unter den geeigneten Hybridisierungsbedingungen das Hybridisieren der Sonden dann, wenn die CG Positionen vor der Bisulfitreaktion methyliert vorlagen (2). Die Sondenolignukleotide werden ligiert (3). Der gebildete Doppelstrang wird nun im nächsten Schritt denaturiert, so dass auch die ligierten Sonden wiederum als Templat dienen können (4). An dieses hybridisieren nun die komplementären Sondenolignukleotide (5) und eine erneute Ligation findet statt (6). Nach dem Denaturieren steht der wiederum komplementäre Einzelstrang erneut als Templat zur Verfügung und die Schritte (2) bis (7) können sich mehrfach wiederholen, bis ausreichend Ligationsprodukt gebildet wurde.

Beispiel 3:

MLA unter Verwendung eines Blocker-Oligonukleotids

Werden größere Mengen an Hintergrund-DNA vermutet die zu
5 falsch positiven Ergebnissen beitragen kann, so kann zusätzlich ein Blocker für die Hintergrund DNA wie oben beschrieben eingesetzt werden. Wird das Experiment analog zu Beispiel 2 ausgeführt, so kann als Blocker
TGTGGTTGATGTTTG (SEQ-ID:6) verwendet werden. Dieser Blocker bindet bevorzugt dann, wenn die Hintergrund-DNA in
10 diesem Bereich vollständig unmethyliert vorlag. Unter diesen Bedingungen ist es möglich, noch bei einem Verhältnis von 1:100 bis 1:1000 je nach DNA Gesamtkonzentration aufmethylierte Template nachzuweisen, ohne falsch
15 positive Ergebnisse für die vollständig unmethylierte Kontroll-DNA zu riskieren.

In Figur 2 ist der Einsatz eines Blockeroligonukleotids dargestellt. Selbiges bindet an die Templat-DNA (1) und
20 verhindert die Hybridisierung der Oligonukleotidsonden. Damit bleibt nach Dehybridisierung nur der Templatstrang erhalten, eine Ligation findet nicht statt.

Wird ein Templatstrang eingesetzt, welcher aufmethylierter DNA entspricht (1a), so kann keine Hybridisierung des
25 Blockeroligonukleotids stattfinden. Die Hybridisation der Sondenolignukleotide sowie deren Ligation verläuft im wesentlichen ungehindert (2a). Es entsteht ein Ligationsprodukt (3a).

Beispiel 4:

Verwendung eines MLA-Assays mit zusätzlicher Polymerase-reaktion

35 Die Sequenz GGGCGTTTTTTTTCGGTCGACGTTCTGGGGTGTA (SEQ-ID:1) (nach Bisulfit-Behandlung) wurde untersucht. Diese Se-

quenz liegt vor, wenn die betreffenden Methylierungspositionen in der DNA-Probe methyliert vorlagen. Es wurde die mit Sss1 und mit Bisulfit behandelte DNA-Probe des Beispiels 1 verwendet. Die Sondenoligonukleotide

5 GGGGCGTTTTTTTTCGG (SEQ-ID:7) und TCGACGTTTCGGGGT (SEQ-ID:3) sowie die dazu komplementären Sondenoligonukleotide CAAAAAACGCCCC (SEQ-ID:8) und ACCCCGAACGTCGA (SEQ-ID:5) wurden verwendet, wobei alle Sondenoligonukleotide jeweils mittels Polynucleotid Kinase zuvor am 5'-Ende
10 phosphoryliert wurden. Zusätzlich wurden Taq Polymerase (Amplitaq) und Nukleotide Für die Ligation wurden Bedingungen wie in WO 94/08047 und EP0439182 beschrieben verwendet.

15 Wiederum wurden die Ligationsprodukte mittels Polyacrylamid-gelelektrophorese nachgewiesen.

Ein Kontrollexperiment mit nicht aufmethylierter Kontroll-DNA gemäß Beispiel 1 ergab hingegen kein nachweisbares Produkt.
20

In einer Variante des Verfahren ist es nun möglich, nicht alle Nukleotide einzusetzen. Beipielsweise können im obigen Beispiel nur dGTP, dCTP und ddATP als Nukleotide eingesetzt werden. Das ddATP wird nur eingebaut, wenn unbeabsichtigt ein nicht methyliertes Fragment als Templat in
25 der Polymerasereaktion zum Einsatz kommt. In diesem Fall kann jedoch, da es als Terminator dient, keine Ligation mehr stattfinden.

30 Die Ligase/Polymerasereaktion ist schematisch in Figur 3 dargestellt. Nach der Behandlung mit Bisulfit liegt die DNA einzelsträngig vor (1) und erlaubt unter den geeigneten Hybridisierungsbedingungen das Hybridisieren der Sonden dann, wenn die CG Positionen vor der Bisulfitreaktion
35 methyliert vorlagen (2). Die Lücke zwischen den Sonden

wird in einer Polymerasereaktion aufgefüllt und nachfolgend werden die Sonden ligiert (3). Der gebildete Doppelstrang wird nun im nächsten Schritt denaturiert, so dass auch die ligierten Sonden wiederum als Templat dienen können (4). An dieses hybridisieren nun die komplementären Sondenolignukleotide (5) und eine erneute Ligation findet statt (6). Nach dem Denaturieren steht der wiederum komplementäre Einzelstrang erneut als Templat zur Verfügung und die Schritte (2) bis (7) können sich mehrfach wiederholen, bis ausreichend Ligationsprodukt gebildet wurde.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierung in
5 DNA-Proben, dadurch gekennzeichnet, dass man die folgenden Schritte ausführt:
a) man behandelt eine genomische DNA-Probe derart, dass die nicht methylierten Cytosinbasen in Uracil umgewandelt werden, während die 5-Methylcytosinbasen
10 unverändert bleiben;
b) man amplifiziert die chemisch behandelte DNA-Probe unter Verwendung von mindestens 2 Paaren von im wesentlichen komplementären Sondenoligonukleotiden sowie einer Ligase und
15 c) man analysiert die Amplifikate und schließt aus dem Vorliegen eines Amplifikates auf den Methylierungsstatus in der zu untersuchenden DNA.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
20 dass im zweiten Schritt die zu untersuchende DNA gegenüber der sequenzhomologen Hintergrund-DNA als Templat bevorzugt wird.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch
25 gekennzeichnet, dass man aus der Analyse weiterer Positionen in dem Amplifikat auf den Methylierungsstatus in der zu untersuchenden DNA schliesst.
4. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,
30 wobei in Schritt b) des Anspruchs 1 die Sondenoligonukleotide dann an ein Templat hybridisieren, wenn die von diesen abgedeckten CpG Positionen in der genomischen DNA-Probe (bzw. der zu untersuchenden DNA) methyliert vorlagen und wobei die gleichen Sondenoligonukleotide an Template, die an diesen Positionen
35

ganz oder teilweise unmethyliert vorlagen, in wesentlich geringerem Maße hybridisieren.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei in Schritt b) des Anspruchs 1 die Sondenoligonukleotide dann an ein Templat hybridisieren, wenn die von diesen abgedeckten CpG Positionen in der genomischen DNA-Probe (bzw. der zu untersuchenden DNA) unmethyliert vorlagen und wobei die gleichen Sondenoligonukleotide an Template, die an diesen Positionen ganz oder teilweise methyliert vorlagen, in wesentlich geringerem Maße hybridisieren.
6. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Schritt b) des Anspruchs 1 im Detail wie folgt ausgeführt wird:
- a) die Sondenoligonukleotide, welche an benachbarten Positionen auf dem Templat hybridisierten, werden durch Ligation miteinander verknüpft,
 - b) die verknüpften Sondenoligonukleotide werden dehybridisiert,
 - c) die zu den verknüpften Sondenoligonukleotiden komplementären Sondenoligonukleotide hybridisieren an die bereits verknüpften Sondenoligonukleotide und werden durch Ligation ihrerseits verknüpft und
 - d) die verknüpften Sondenoligonukleotide dienen als Template für weitere Ligationsschritte, so dass eine weitere Vermehrung der verknüpften Sondenoligonukleotide erfolgt.
7. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest eines der Sondenoligonukleotide am 5'-Ende eine Phosphatgruppe trägt.

8. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest eines der Sondenolignukleotide mit einer durch Fluoreszenz nachweisbaren Markierung versehen ist.

5

9. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eines der Sondenoligonukleotide mit einer nachweisbaren Markierung versehen ist.

10

10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens zwei Sondenoligonukleotide mit Markierungen versehen sind, wobei diese ihre Eigenschaften in Abhängigkeit von ihrem Abstand zueinander ändern.

15

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Sondenoligonukleotide mindestens eine Fluoreszenzmarkierung tragen.

20

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Sondenmoleküle die Amplifikation entweder durch eine Zunahme oder eine Abnahme der Fluoreszenz anzeigen.

25

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass man die Zunahme oder Abnahme der Fluoreszenz auch direkt zur Analyse verwendet und aus dem veränderten Fluoreszenzsignal auf einen Methylierungszustand der zu untersuchenden DNA schließt.

30

14. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Hintergrund-DNA in 100 facher Konzentration im Vergleich zur zu untersuchenden DNA vorliegt.

35

15. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Hintergrund-DNA in 1000 facher Konzentration im Vergleich zur zu untersuchenden DNA vorliegt.
- 5
16. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man die Proben DNA aus Serum oder anderen Körperflüssigkeiten eines Individuums gewinnt.
- 10
17. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man die Proben DNA aus Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Serum, Gehirnrückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetem Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, 15 Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologischen Objektträgern und allen möglichen Kombinationen hiervon gewinnt.
- 20
18. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man Schritt a) des Anspruchs 1 mit einem Bisulfit (=Disulfit, Hydrogensulfit) durchführt.
- 25
19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die chemische Behandlung nach Einbetten der DNA in Agarose erfolgt.
- 30
20. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass bei der chemischen Behandlung ein die DNA-Duplex denaturierendes Reagenz und/oder ein Radikalfänger zugegen ist.
- 35
21. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Analyse gemäß Anspruch 1c) mittels Hybridisierung an Oligomer-Arrays

erfolgt, wobei Oligomere Nukleinsäuren oder in ihren Hybridisierungseigenschaften ähnliche Moleküle wie PNAs sein können.

- 5 22. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass die Analyse gemäß An-
spruch 1c) mittels Längenmessung der amplifizierten
zu untersuchenden DNA erfolgt, wobei Methoden zur
10 Längenmessung Gelelektrophorese, Kapillargele-
lektrophorese, Chromatographie (z.B. HPLC), Mas-
senspektrometrie und andere geeignete Methoden umfas-
sen.
- 15 23. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass die Analyse gemäß An-
spruch 1c) mittels Sequenzierung erfolgt, wobei Me-
thoden zur Sequenzierung die Sanger-Methode, Maxam-
Gilbert-Methode und andere Methoden wie Sequencing by
20 Hybridisation (SBH) umfassen.
24. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass man aus dem Methylierung-
status an den verschiedenen untersuchten CpG Po-
sitionen auf das Vorliegen einer Erkrankung oder eines
25 anderen medizinischen Zustandes des Patienten
schließt.
25. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikate selbst
30 für die Detektion mit einer nachweisbaren Markierung
versehen sind.
26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet,
dass die Markierungen Fluoreszenzmarkierungen sind.

35

27. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen Radionuklide sind.
- 5 28. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen ablösbare Massenmarkierungen sind, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden.
- 10 29. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikate insgesamt im Massenspektrometer nachgewiesen werden und somit durch ihre Masse eindeutig charakterisiert sind.
- 15 30. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich zu den Sondenolignukleotiden ein Blockeroligonukleotid eingesetzt wird, welches bevorzugt an die Hintergrund-DNA bindet und die Hybridisierung der Sondenolignukleotide an die Hintergrund-DNA behindert.
- 20 31. Verfahren nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, dass zwei zueinander komplementäre Blockeroligonukleotide (oder Blocker-PNAs, allgemein Blockermoleküle) verwendet werden.
- 25 32. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass die Blockermoleküle bevorzugt an Templatstränge binden, die in ihrer Sequenz einer methyliert vorliegenden DNA nach Behandlung gemäß Anspruch 1a) entsprechen.
- 30 33. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass die Blockermoleküle bevorzugt an Templatstränge binden, die in ihrer Sequenz einer unmethyliert vorliegenden DNA nach Behandlung gemäß Anspruch 1a) entsprechen.
- 35

34. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 33, dadurch gekennzeichnet, dass die Blockermoleküle an mehrere CpG Positionen in der Templat-DNA binden.
- 5
35. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 33 dadurch gekennzeichnet, dass die Blockermoleküle an mehrere TpG oder CpA Positionen in der Templat-DNA binden.
- 10
36. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 35, dadurch gekennzeichnet, dass die Blockeroligonukleotide an ihrem 3'-Ende modifiziert sind und von einer Polymerase mit Nukleaseaktivität nicht wesentlich abgebaut werden können.
- 15
37. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Schritt b) des Anspruchs 1 im Detail wie folgt ausgeführt wird:
- 20
- a) die Sondenoligonukleotide (Sonde), hybridisieren derart an Positionen auf dem Templatstrang, dass zwischen dem 3'-Ende der ersten Sonde und dem 5'-Ende der zweiten Sonde eine Lücke von mindestens einer Base verbleibt,
- 25
- b) das 3'-Ende der ersten Sonde wird durch eine Polymerasereaktion verlängert, wobei zu dem Templatstrang jeweils komplementäre Nukleotide eingebaut werden,
- 30
- c) die verlängerte erste Sonde wird mit der verlängerten zweiten Sonde durch Ligation verknüpft,
- d) die verknüpften Sondenoligonukleotide werden dehybridisiert,
- 35
- e) die zu den verknüpften Sondenoligonukleotiden komplementären Sondenoligonukleotide hybridisieren an die bereits verknüpften Sondenoligonukleotide und werden durch Ligation ihrerseits verknüpft und
- f) die verknüpften Sondenoligonukleotide dienen

als Template für weitere Ligationsschritte, so dass eine weitere Vermehrung der verknüpften Sondenoligonukleotide erfolgt.

- 5 38. Verfahren nach Anspruch 37, dadurch gekennzeichnet, dass auch Schritt e) des Anspruchs 37 analog den Schritten a) - c) ausgeführt wird.
- 10 39. Verfahren nach einem der Ansprüche 37 oder 38, dadurch gekennzeichnet, dass eine hitzestabile Polymerase verwendet wird.
- 15 40. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass eine hitzestabile Ligase verwendet wird.
- 20 41. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mehrere Sätze von Oligonukleotidsonden für mehrere Gruppen von Methylierungspositionen eingesetzt werden und damit eine Multiplexierung des Assay erreicht wird.
- 25 42. Verwendung eines Verfahrens nach einem der voranstehenden Ansprüche zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressions-symptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung;
- 30 Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder
- 35

- Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion,
- 5 Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.
- 10 43. Verwendung eines Verfahrens nach einem der voranstehenden Ansprüche zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.
- 15 44. Kit, bestehend aus einem Bisulfit enthaltenen Reagenz, markierten Oligonukleotidsonden, einer bevorzugt thermostabilen Ligase und Puffern sowie optional einer Anleitung zur Durchführung eines erfindungsgemäßen Assays.
- 20

Fig. 1

1)

5'-GGGGCGTTTTTTTTCGGGTCGACGTTTCGGGGTGTA-3'

5

2)

CCCCGCAAAAAACGCC AGCTGCAAGCCCCA

5'-GGGGCGTTTTTTTTCGGGTCGACGTTTCGGGGTGTA-3'

10

3)

CCCCGCAAAAAACGCCAGCTGCAAGCCCCA

5'-GGGGCGTTTTTTTTCGGGTCGACGTTTCGGGGTGTA-3'

15

4)

3'-CCCCGCAAAAAACGCCAGCTGCAAGCCCCA-5'

5)

3'-CCCCGCAAAAAACGCCAGCTGCAAGCCCCA-5'

20

GGCGTTTTTTTTCGGG TCGACGTTTCGGGGT

6)

3'-CCCCGCAAAAAACGCCAGCTGCAAGCCCCA-5'

25

GGCGTTTTTTTTCGGGTCGACGTTTCGGGGT

7)

5'-GGCGTTTTTTTTCGGGTCGACGTTTCGGGGT-3'

30

Fig. 2

1)

5

3'-CCCCGCAAAAAAACACCAACTACAAACCCCA-5'
TGTGGTTGATGTTTG

GGGGCGTTTTTTTTGCGG TCGACGTTTCGGGGT

10

2)

3'-CCCCGCAAAAAAACGCCAGCTGCAAGCCCCA-5'

15

1a)

TGTGGTTGATGTTTG

20

3'-CCCCGCAAAAAAACGCCAGCTGCAAGCCCCA-5'

GGGGCGTTTTTTTTGCGG TCGACGTTTCGGGGT

25

2a)

3'-CCCCGCAAAAAAACGCCAGCTGCAAGCCCCA-5'
GGGGCGTTTTTTTTGCGGTCGACGTTTCGGGGT

30

3a)

5'-GGGGCGTTTTTTTTGCGGTCGACGTTTCGGGGT-3'

35

Fig. 3

1)
5 5'-GGGGCGTTTTTTTTCGGTCGACGTTTCGGGGTGTA-3'

2)
 CCCCGCAAAAAAAC AGCTGCAAGCCCCA
10 5'-GGGGCGTTTTTTTTCGGTCGACGTTTCGGGGTGTA-3'

3)
 CCCCGCAAAAAAAC**GCC**AGCTGCAAGCCCCA
15 5'-GGGGCGTTTTTTTTCGGTCGACGTTTCGGGGTGTA-3'

4)
20 3'-CCCCGCAAAAAAACGCCAGCTGCAAGCCCCA-5'

5)
 CCCCGCAAAAAAACGCCAGCTGCAAGCCCCA-5'

25 GGGGCGTTTTTTTTCGG TCGACGTTTCGGGGT

6)
3'-CCCCGCAAAAAAACGCCAGCTGCAAGCCCCA-5'

30 GGGGCGTTTTTTTTCGGTCGACGTTTCGGGGT

7)
5'-GGGGCGTTTTTTTTCGGTCGACGTTTCGGGGT-3'